

<b>Thesis Title</b>	Effects of <i>Centella asiatica</i> and <i>Rhinacanthus nasutus</i> Extracts on Mycotoxin-Induced Immunomodulation	
<b>Author</b>	Miss Khanittha Punturee	
<b>Degree</b>	Doctor of Philosophy (Biochemistry)	
<b>Thesis Advisory Committee</b>	Assoc. Prof. Dr. Usanee Vinitketkumnuen	Chairperson
	Assoc. Prof. Dr. Watchara Kasinrerak	Member
	Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert	Member
	Prof. Dr. Christopher Paul Wild	Member

## ABSTRACT

Thai medicinal plants have been used for centuries to relieve symptoms of a number of diseases. Such plants display many pharmacological properties, including anti-cancer and anti-inflammatory activities. However, precise knowledge of the immunomodulatory activity of Thai medicinal plants is still lacking. Mycotoxins are secondary fungal metabolites that contaminate cereals and nuts and cause a variety of ill effects in humans, including acute toxicity, immunomodulation and cancer. The major mycotoxins found in Thailand include aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), deoxynivalenol (DON) and fumonisin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) and these commonly occur as mixtures in a contaminated foodstuff or animal feed. However, little is known about the interactions between these mycotoxins with regard to toxic and carcinogenic effects. This study aimed to evaluate Thai medicinal plants that may stimulate the immune system, to investigate the effects of mycotoxin mixtures on the immune system, and finally to determine whether the medicinal plants could modulate the immune effects of mycotoxins.

A number of immune parameters were considered in this study following exposure to Thai plant extracts and mycotoxins. Human peripheral blood mononuclear cell (PBMCs) proliferation *in vitro* was examined with or without mitogen (phytohemagglutinin; PHA or pokeweed mitogen; PWM); specific antibody production against bovine serum albumin (BSA) was addressed *in vivo* in BALB/c mice and a mouse macrophage cell line (J774.2) was treated with test samples in the presence or not of lipopolysaccharide (LPS).

An aqueous extract of *Centella asiatica* and *Rhinacanthus nasutus* was immunostimulatory by increasing human lymphocyte proliferation in the presence of mitogen. Ethanol extracts of *C. asiatica* inhibited mitogen-induced mitogenesis whilst ethanol extracts of *R. nasutus* increased the proliferation of both PHA- and PWM-induced lymphocytes. The water extracts of *C. asiatica* and *R. nasutus* both increased interleukin-2 (IL-2) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) production, whilst the ethanol extract of *C. asiatica* inhibited production of both. Furthermore, aqueous extracts of both *C. asiatica* and *R. nasutus* significantly increased antibody responses to BSA when compared with untreated control mice.

An alternative mechanism of immunomodulation by *C. asiatica* and *R. nasutus* is to alter macrophage function. The water extract of *C. asiatica* increased the production of nitric oxide (NO) in J774.2 cells either alone or after LPS and this reflected a concomitant induction of TNF- $\alpha$  gene expression. This phenomenon was also observed with *R. nasutus* extracts in combination with LPS. In contrast, an ethanol extract of *C. asiatica* dramatically inhibited NO production through the suppression of TNF- $\alpha$  with an accompanying decrease in inducible nitric oxide synthase (iNOS) and TNF- $\alpha$  gene expression. Moreover, the water extract of *C. asiatica* increased cytolytic activities of macrophages against B16F10, consistent with a proposed anti-tumor activity. Overall, these data showed that water extracts of *C. asiatica* and *R. nasutus* 1) increased human T lymphocyte proliferation by a stimulation of cytokine production, 2) increased macrophage function, and 3) stimulated B cell proliferation and subsequently increased specific antibody production.

Both DON and AFB<sub>1</sub> alone inhibited lymphocyte proliferation whilst FB<sub>1</sub> had no effect. A mixture of DON with either AFB<sub>1</sub> or FB<sub>1</sub> displayed synergistic effects on the proliferation of human PBMCs. In mouse macrophages, AFB<sub>1</sub> alone decreased the production of NO and TNF- $\alpha$  whereas FB<sub>1</sub> increased both. DON alone inhibited NO production but increased TNF- $\alpha$

production. A mixture of AFB<sub>1</sub> with DON inhibited NO production to a greater degree than did the individual mycotoxins, whilst with FB<sub>1</sub> there was actually a further increase in NO production. An antagonistic effect was observed when DON was combined with either AFB<sub>1</sub> or FB<sub>1</sub> in that TNF- $\alpha$  production was decreased in macrophages compared to the DON control. Although AFB<sub>1</sub> and FB<sub>1</sub> diminished the level of TNF- $\alpha$ , potent induction of TNF- $\alpha$  by DON still existed in mixtures with the other mycotoxins. On the other hand, an AFB<sub>1</sub>-FB<sub>1</sub> mixture led to increased TNF- $\alpha$  level. These results imply the need for further emphasis on the interaction between mycotoxins with regard to immunomodulation.

Pretreatment of lymphocytes or macrophages with the aqueous extracts of *C. asiatica* and *R. nasutus* modified mycotoxin-induced effects. Pretreatment with these extracts could reverse the inhibition of NO and lymphocyte proliferation caused by either DON or AFB<sub>1</sub>. The underlying mechanisms may involve the induction of cytokine production, increased macrophage function, or increased lymphocyte activity. Suppression of the immune system by mycotoxins, particularly when occurring as mixtures, may increase host susceptibility to various diseases including cancer. Thai medicinal plants such as *C. asiatica* and *R. nasutus* may reduce these risks through enhancing the immune status of individuals in exposed populations. Understanding the underlying mechanisms of action is vital if the value of these plants is to be fully appreciated.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลของสารสกัดบัวบกและทองพันชั่งต่อการเปลี่ยนแปลงระบบภูมิคุ้มกัน  
ที่เหนี่ยวนำโดยสารพิษจากเชื้อรา

ผู้เขียน นางสาว ขนิษฐา พันธุ์

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. อุษณีย์ วจินเขตค้ำนวน

ประธานกรรมการ

รศ. ดร. วัชรระ กลินฤกษ์

กรรมการ

รศ. ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ

กรรมการ

Prof. Dr. Christopher Paul Wild

กรรมการ

#### บทคัดย่อ

สมุนไพรไทยซึ่งมีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยามากมาย รวมไปถึงคุณสมบัติในการต่อต้านมะเร็งและต่อต้านการอักเสบ ถูกนำมาใช้ในการบรรเทาอาการของโรคต่างๆ มาหลายศตวรรษ อย่างไรก็ตามความรู้ด้านผลของสมุนไพรไทยต่อระบบภูมิคุ้มกันยังมีน้อย สารพิษจากเชื้อราทำให้เกิดโรคต่างๆ รวมไปถึงโรคมะเร็ง สารพิษจากเชื้อราที่พบมากในเมืองไทยได้แก่ อะฟลาทอกซินบีหนึ่ง (AFB<sub>1</sub>) คือออกซีนิวาลินอล (DON) และฟิวโมนิซินบีหนึ่ง (FB<sub>1</sub>) และมักพบสารพิษจากเชื้อราหลายชนิดร่วมกันในสิ่งทีบริโภคและในอาหารสัตว์ แต่ปัจจุบันยังขาดการศึกษาเกี่ยวกับความเป็นพิษที่เกิดจากสารพิษจากเชื้อราหลายชนิดร่วมกัน ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการศึกษานี้คือ ศึกษาผลของสารพิษจากเชื้อราหลายชนิดร่วมกันต่อระบบภูมิคุ้มกัน พร้อมศึกษาหาสมุนไพรไทยที่มีคุณสมบัติกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อนำมาศึกษาถึงผลของสมุนไพรไทยต่อการลดความเป็นพิษที่เกิดจากสารพิษจากเชื้อราเหล่านี้

การศึกษานี้ได้ทดสอบผลของสารพิษจากเชื้อราและผลของสารสกัดสมุนไพรไทยต่อการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เซลล์ลิมโฟไซต์จากมนุษย์นำมาทดสอบในสถานะที่มีหรือไม่มีไมโตเจน นอกจากนี้ยังได้ทดสอบการสร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อ bovine serum albumin (BSA) ในสัตว์ทดลองโดยใช้หนูขาวสายพันธุ์ BALB/c สำหรับมาโครฟาจที่ใช้เซลล์ชนิด J774.2 ในการทดสอบโดยเลี้ยงร่วมกับสารที่ต้องการทดสอบในสถานะที่มีหรือไม่มีไลโปโพลีแซคคาไรด์ (LPS)

สารสกัดบัวบกและทองพันชั่งด้วยน้ำมีฤทธิ์ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน โดยเพิ่มการแบ่งตัวของลิมโฟไซต์ในภาวะที่กระตุ้นร่วมกับไมโตเจน สารสกัดบัวบกด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของลิมโฟไซต์ใน

ขณะที่สารสกัดทองพันชั่งด้วยเอทานอลมีผลเพิ่มการแบ่งตัวของลิมโฟไซต์ สารสกัดบัวบกและทองพันชั่งมีผลเพิ่มการผลิต interleukin-2 (IL-2) และ tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ในขณะที่สารสกัดบัวบกด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งทั้ง IL-2 และ TNF- $\alpha$  นอกจากนี้หนูทดลองที่ได้รับสารสกัดบัวบกและทองพันชั่งด้วยน้ำมีการผลิตแอนติบอดีจำเพาะต่อ BSA มากกว่าหนูกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด

กลไกหนึ่งในการเปลี่ยนแปลงระบบภูมิคุ้มกันของสารสกัดบัวบกและทองพันชั่งคือการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเซลล์มาโครฟาจ สารสกัดบัวบกด้วยน้ำมีผลทำให้มาโครฟาจเพิ่มการผลิตไนตริกออกไซด์ (NO) และ TNF- $\alpha$  ซึ่งเป็นผลมาจากคุณสมบัติของสารสกัดในการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้าง TNF- $\alpha$  เมื่อทำการกระตุ้นเซลล์มาโครฟาจด้วยสารสกัดทองพันชั่งร่วมกับ LPS ให้ผลเช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้ว ในทางตรงกันข้าม สารสกัดบัวบกด้วยเอทานอลมีผลยับยั้งการผลิต NO และ TNF- $\alpha$  ซึ่งเป็นผลจากการลดการแสดงออกของยีนที่กำหนดการสร้าง inducible nitric oxide synthase (iNOS) และ TNF- $\alpha$  นอกจากนี้สารสกัดบัวบกด้วยน้ำยังมีฤทธิ์ในการเพิ่มการทำงานของเซลล์มาโครฟาจในการทำลายเซลล์มะเร็งชนิด B16F10 อีกด้วย จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดบัวบกและทองพันชั่งด้วยน้ำมีฤทธิ์ในการเพิ่มการแบ่งตัวของลิมโฟไซต์ชนิด ที โดยเพิ่มการผลิตไซโตไคน์ เพิ่มการทำงานของมาโครฟาจและทำให้ลิมโฟไซต์ชนิด บี มีการแบ่งตัวเพิ่มมากขึ้นจึงทำให้มีการตอบสนองต่อแอนติเจนจำเพาะดีขึ้นด้วย

ทั้ง DON และ AFB<sub>1</sub> ชนิดเดียวมีผลยับยั้งการแบ่งตัวของลิมโฟไซต์ ขณะที่ FB<sub>1</sub> ไม่มีผลต่อลิมโฟไซต์ สารผสมระหว่าง DON กับ AFB<sub>1</sub> หรือ FB<sub>1</sub> มีผลเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ลิมโฟไซต์ ในเซลล์มาโครฟาจ AFB<sub>1</sub> ชนิดเดียวลดการผลิต NO และ TNF- $\alpha$  ในขณะที่ FB<sub>1</sub> มีผลเพิ่มการผลิตสารทั้งสองชนิด ส่วน DON มีผลลดการสร้าง NO แต่สามารถกระตุ้นการผลิต TNF- $\alpha$  ได้ เมื่อผสม AFB<sub>1</sub> ร่วมกับ DON สามารถยับยั้งการผลิต NO ได้มากกว่าผลที่เกิดจากสารพิษจากเชื้อราแต่ละชนิดในขณะที่ AFB<sub>1</sub> ร่วมกับ FB<sub>1</sub> มีผลในทางตรงกันข้ามคือเพิ่มการผลิต NO เมื่อทดสอบผลของสารผสม DON กับ AFB<sub>1</sub> หรือ FB<sub>1</sub> ต่อการผลิต TNF- $\alpha$  ในเซลล์มาโครฟาจพบว่าผลหักล้างกัน โดยพบว่าการผลิต TNF- $\alpha$  ลดลงเทียบกับเมื่อกระตุ้นด้วย DON ชนิดเดียว แม้ว่า AFB<sub>1</sub> และ FB<sub>1</sub> จะมีผลลดระดับของ TNF- $\alpha$  อย่างไรก็ตามระดับนี้ยังคงสูงมากเมื่อเทียบกับภาวะที่ไม่มีสารพิษจากเชื้อรา ผลนี้เกิดจากการกระตุ้นการสร้าง TNF- $\alpha$  ของ DON ในทางตรงกันข้ามพบว่า สารผสม AFB<sub>1</sub> กับ FB<sub>1</sub> ทำให้การผลิต TNF- $\alpha$  เพิ่มขึ้น ผลการทดลองทั้งหมดชี้ให้เห็นว่าการศึกษาต่อไปควรคำนึงถึงผลของสารพิษจากเชื้อราหลายชนิดร่วมกันมากกว่าผลที่เกิดจากสารพิษจากเชื้อราแต่ละชนิด

การกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์และมาโครฟาจด้วยสารสกัดบัวบกและทองพันชั่งด้วยน้ำก่อนที่จะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับสารพิษจากเชื้อรา สามารถเปลี่ยนแปลงผลที่เกิดจากสารพิษจากเชื้อราได้ สารสกัดเหล่านี้ทำให้เซลล์สร้าง NO และแบ่งตัวได้เพิ่มขึ้นซึ่งกลไกที่เกี่ยวข้องอาจเกิดจากคุณสมบัติของสารสกัดในการกระตุ้นการผลิตไซโตไคน์ และการเพิ่มการทำงานของเซลล์ลิมโฟไซต์และมาโครฟาจ สารพิษจากเชื้อราที่มีผลลดระบบภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีสารพิษจากเชื้อราหลายชนิดร่วมกัน ส่งผลให้เจ้าบ้านมีความไวต่อการติดเชื้อโรคต่างๆ รวมไปถึงโรคมะเร็งด้วย สมุนไพรไทยเช่นบัวบกและทองพันชั่งอาจช่วยลดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อโรคนี้โดยการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย